

カップリング基は可能であり、分子を合成する能力および官能基の反応性によって一般的に限定されるのみである。一般的に、カップリング基は、合成的要求のために少なくとも一つの炭素原子を含み；しかしながら、いくつかの具体例において、該カップリング基は、まさに官能基を含み得る。

#### 【0140】

好ましい具体例において、該カップリング基は、スペーサーとしてさらなる原子を含む。当業者によって認められるごとく、非常に様々な基を用いることができる。例えば、カップリング基は、1以上の官能基で置換したアルキルまたはアリール基を含み得る。かくして、一の具体例において、後記のごときポリマー具体例と同様に、多数のMRIコントラスト剤の結合について複数の官能基を含むカップリング基を用いることができる。例えば、多数の官能基を含む分岐したアルキル基は、いくつかの具体例において望ましい。

#### 【0141】

さらなる具体例において、該リンカーはポリマーである。この具体例において、本発明の少なくとも一つのMRIコントラスト剤を含むポリマーを用いる。当業者によって認められるごとく、これらのMRIコントラスト剤は、モノマー（すなわち、一つの金属イオン、一つのキレート化剤、一つのプロッキング基）または一般的に後記されるごとく二重（すなわち、2つの金属イオン、2つのキレート化剤、1つのプロッキング基）であり得る。好ましい具体例は、ポリマー当り複数のMRI剤を利用する。ポリマー当りのMRI剤数は単位長さ当りのMRI剤の密度およびポリマーの長さに依存するであろう。

#### 【0142】

ポリマーの特性は変更するが、重要なことはポリマーが本発明のMRIコントラスト剤の結合のための官能基を含むかまたは含むために修飾できることである。適当なポリマーは、官能化されたデキストラン、スチレンポリマー、ポリエチレンおよび誘導体、限定されるものではないが、ヘパリン、ポリガラクトロン酸、ムチン、核酸のポリマーを含めたポリアニオンおよび修飾リボス-リン酸骨格で修飾されたものを含めたそれらのアナログ、ポリペプチド、ポリグルタメートおよびポリアスパルテート、ならびに合成ポリマーのカルボン酸、リン酸およ

びスルホン酸誘導体；限定されるものではないが、アクリルアミドおよび2-アクリルアミド-2-メチルプロパントリメチルアミンに基づく合成ポリカチオン、ポリ(N-エチル-4-ビニルピリジン)または同様な第四級化されたポリピリジン、ジエチルアミノエチルポリマーおよびデキストラン抱合体、硫酸ポリミキシンB、リポポリアミン、強いポリカチオン ポリ(ジメチルジアルキルアンモニウムクロリド)のごときポリ(アリルアミン)、ポリエチレンジアミン、ポリブレン、スベルミン、スベルミジンおよびプロタミン、ヒストンポリペプチド、ポリリジン、ポリアルギニンおよびポリオルニチンのごときポリペプチド；およびこれらの混合物および誘導体を含む。特に 好ましいポリカチオンは、ポリリシンおよびスベルミジンであり、前者が特に好ましい。ポリリシンの両光学異性体を用いることができる。D異性体は、細胞プロテアーゼに長時間耐性を有する利点を有する。L異性体は、対象からより迅速になる利点を有する。当業者によって認められるごとく、線形および分岐したポリマーを用いることもできる。

#### 【0143】

好ましいポリマーは、高いpHにてリジン側鎖の-NH<sub>2</sub>基が活性化された複数の結合につき強い求核分子として機能するためにポリリシンである。高いpHにて、リジンモノマーは、平均5-20% モノマー置換の取率の条件下でMRI剤にカップリングする。

#### 【0144】

いくつかの具体例において、特に帯電したポリマーが用いられる場合、第一ポリマーと静電的に会合した第一と反対に帯電してポリマー-MRI剤錯体の全荷電を低下させる第二ポリマーがある。この第二ポリマーは、MRI剤を含んでも含まなくてもよい。

#### 【0145】

ポリマーの大きさは、実質的に変更できる。例えば、いくつかの核酸ベクターが長さ100キロベースまでの遺伝子を送達し、人工的染色体(メガベース)は酵母に送達された。従って、ポリマーに対して一般的なサイズ限定はない。しかしながら、ポリマーについての好ましいサイズは、約10ないし約50,000 モノマー単位であり、約2000ないし約5000がとりわけ好ましく、および約

3ないし約25が特に好ましい。

#### 【0146】

本発明の多重結合のMRI剤は、上記にリストしたものを含めて様々な方法で作成できると理解されるべきである。重要なことは、結合方法が薬剤の機能性をかなり変更しなく；すなわち、該薬剤が依然として標的物質の不存在下にて、「オフ」であり、その存在下では「オン」にちがいないことである。

#### 【0147】

好ましい具体例において、本発明のMRIコントラスト剤は、「デュプレックス」である。この具体例において、該MRIデュプレックスは、各々、常磁性金属イオンおよび各キレート化剤の少なくとも一つの配位部位において水の交換を制限する少なくとも一つのブロッキング基を持つ2つのキレート化剤を含む。この方法において、シグナル増幅の分類が生じ、2つの金属イオンが単一標的分子とのシグナルを増大させる。「デュプレックス」は、2つのキレート化剤を意味するが、1を超える金属イオン/キレート化剤錯体に配位原子を与える単一のブロッキング基を含む錯体をいうことを意図する。当業者によって認められるごとく、この具体例のMRI剤は、図10に一般的に示すとき多数の異なる立体配置を有し得る。当業者によって認められるごとく、図の $R_{2a}$ 、 $R_{2b}$  および  $R_{2c}$  は、本明細書に記載されたいずれの位置、いずれのR基または $X_1$ - $X_4$ 、S、T、U、V、W、X、YまたはZ基にも結合できる。

#### 【0148】

上記に概説されるごとく、該MRIデュプレックス基は、直接的な結合またはポリマーへの結合を介してのいずれによっても、より高いマルチマーに結合できる。

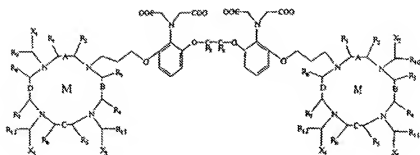
#### 【0149】

好ましい具体例において、該ブロッキング基は、該キレート化剤およびBAPTA誘導体間にプロピル結合基を持つ、構造17に一般的に後記されるごときBAPTAである：

#### 【0150】

【化22】

構造 17



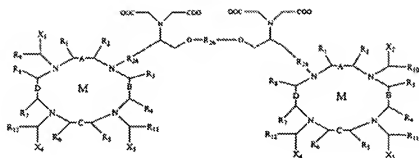
【0151】

当業者によって認められるごとく、構造 17 に示した構造は変更でき、例えば、構造 19 に一般的に後記されるごとく、シクロアルキル基で BAPTA 誘導体のフェニル基を置換し、次いでそれらを完全に取り去ることもできる：

【0152】

【化 23】

構造 19



【0153】

また、上記のごとく、BAPTA 分子のカルボン酸は、アセテート保護を用いて保護して、細胞内に入れるために中性分子とし、次いで細胞内エステラーゼによる切断を介して再活性化できる。

【0154】

さらに、構造 17 および 19 は、BAPTA の橋の酸素間にエチレン基を有するために、メチレンおよびプロピレンは、これらの置換誘導体と同じく、用いることもできる。

## 【0155】

好ましい具体例において、A、B、CおよびDは単結合であり、 $R_1-R_2$ は水素であって、各 $R_3$ は $CH_2$ 基が大環状に結合する $-CH_2O-$ である。

## 【0156】

さらに、本発明の錯体および金属イオン錯体は、1以上の標的基をさらに含むこともできる。すなわち、好ましい具体例において、ターゲティング基が配位原子を置換しないために、ターゲティング基はいずれのR位にても(またはポリマーを含めたリンカーもしくはブロッキング基等に)結合できる。本明細書の「ターゲティング基」とは、特定の位置または会合へ錯体を目標とし、指示するために機能する官能基を意味する。かくして、例えば、抗体、細胞表面受容体配位子およびホルモン、脂質、糖およびデキストラン、アルコール、胆汁酸、脂肪酸、アミノ酸およびペプチドは、特定の部位にコントラスト剤を局在化させ、または標的とするためにすべて結合できる。

## 【0157】

好ましい具体例において、本発明の金属イオン錯体は、水溶性または水溶液に可溶である。本明細書の「水溶液に可溶」とは、該MRI剤が水溶液ならびに他の生理学的な緩衝液および溶液において適当な溶解度を有することを意味する。溶解度は、様々な方法で測定できる。一の具体例において、溶解度は、米国局方溶解度分類を用いて測定でき、金属イオン錯体が(1部の溶質につき1部未満の溶媒を必要とする)極めて溶けやすい、(1部の溶質当たり1ないし10部の溶媒を必要とする)溶けやすい、(1部の溶質当たり30ないし100部の溶媒を必要とする)やや溶けにくい、(1部の溶質当たり100—1000部の溶媒を必要とする)溶けにくいである。

## 【0158】

特定の金属イオン錯体が水溶液に可溶であるかを試験することは当業者によって認められるごときルーチンである。例えば、単一部りのMRI剤を可溶化するのに必要とされる溶媒の部を測定でき、または $g/m^l$ で表される溶解度を決定できる。

## 【0159】

本発明の錯体は、よく知られた技術を用いて一般的に合成される。例えば、Moirら、同上；Tsienら、同上；Borchら、J. Am. Chem. Soc., p2987(1971)；Alexおよびer、(1995)、同上；Jackels(1990)、同上、米国特許第5,155,215号、第5,087,440号、第5,219,553号、第5,188,816号、第4,885,363号、第5,358,704号、第5,262,532号；Meyerら、(1990)、同上、Moirら、(1988)およびMcMurrayら、Bioconjugate Chem. 3(2):108117(1992))参照。

#### 【0160】

DOTA誘導体では、合成は、cyclen環骨格の窒素置換または炭素置換が望ましいかに依存する。窒素置換では、その実施例のガラクトース-DOTA構造によって例示されるごとく、合成は当該技術分野においてよく知られるごときcyclenまたはcyclen誘導体で開始される。例えば、米国特許第4,885,363号および第5,358,704号参照。図3および図4は、ガラクトース-DOTA誘導体によって例示されるごとき窒素置換を示す。

#### 【0161】

炭素置換では、その実施例のBAPTA-DOTA構造によって例示されるごとく、よく知られた技術を用いる。例えば、Moirら、同上およびCansow、同上、参照。図5および図6は、BAPTA-DOTAタイプの誘導体によって例示されるごとき炭素置換を示す。

#### 【0162】

本発明のコントラスト剤は、当該技術分野においてよく知られるごとき適当な金属イオンと錯体化する。本明細書に示した構造は金属イオンを含むが、本発明のコントラスト剤は金属イオンを初期に存在させるのを必要としないと理解されるべきである。金属イオンは、オキシドの形態において、またはハライドの形態において水に添加し、当量モルのコントラスト剤 組成物で処理できる。該コントラスト剤は、水溶液または懸濁剤として添加できる。希酸または塩基は、中性pHを維持するのに必要ならば添加できる。100℃と同様に高い温度での加熱が必要である。

#### 【0163】

本発明の錯体は、例えばHPLCシステムを用いて単離し精製できる。

また、コントラスト剤の医薬上許容される塩を含む医薬組成物は、錯体を中性化する塩基を用いて調製できるが、それらは依然として溶液にある。いくつかの錯体は、形式上帯電しておらず、対イオンを必要としない。

#### 【0164】

一度合成されたならば、本発明の金属イオン錯体は、磁気共鳴造影コントラスト剤または増強剤として使用した。特に、本発明の機能性MRI剤は、いくつかの重要な使用を有する。第一には、以下に概説されるごとく、それらを用いて脳の疾患状態を診断できる。第二には、それらは、心筋梗塞—対—虚血のリアルタイム検出および区別に用いることもできる。第三には、*in vivo*にて、すなわち、完全な生物において、腫瘍の局在につき抗原および免疫細胞化学の研究に用いることもできる。第四には、毒物および薬物の結合部位の同定および局在において用いることもできる。さらに、それらを用いて薬物治療に対する生理的応答の迅速なスクリーニングを行うのに用いることもできる。

#### 【0165】

本発明の金属イオン錯体は、公知のガドリニウムMRI剤に対して同様の方法で用いることもできる。例えば、Meyerら、同上；米国特許第5,155,215号；米国特許第5,087,440号；Margerstadtら、Magn. Reson. Med. 3：808(1986)；Rungeら、Radiology 166：835(1988)；およびBousquetら、Radiology 166：693(1988)参照。該金属イオン錯体は、当該技術分野において知られるごとく、細胞、組織または患者に投与される。本発明の目的についての「患者」は、実験動物のごとく、ヒトおよび他の動物ならびに生物を含む。かくして、該方法は、ヒト治療および獣医的適用の双方に適用できる。さらに、本発明の金属イオン錯体は、画像組織または細胞に用いることもできる。例えば、Aguayoら、Nature 322：190(1986)参照。

#### 【0166】

一般的に、本発明のコントラスト剤錯体の滅菌水溶液は、0.003ないし1.0モラーの濃度にて経口、くも膜下および特に静脈内を含めた様々な方法において患者に投与され、体重キログラム当たり0.03、0.05、0.1、0.2およ

び0.3の用量が好ましい。用量は画像化されるべき構造に依存できる。同様の錯体についての適当な用量レベルは、米国特許第4,885,363号および第5,358,704号に概説されている。

#### 【0167】

さらに、本発明のコントラスト剤は、特殊化された送達システムを介して送達できる。例えば、リボソーム内(Navon, Magn. Reson. Med. 3:876-880(1986))または異なる器官によって選択的に集めることができるミクロスフェア(米国特許第5,155,215号)参照。

#### 【0168】

いくつかの具体例において、本発明のMRI剤の血中クリアランス時間(または半減期)を増大させることを望ましい。これは、例えば、該キレート化剤に炭水化物ポリマーを添加することによってなされた(米国特許第5,155,215号参照)。かくして、一の具体例は、本発明の組成物の置換R基として多糖類を利用する。

#### 【0169】

好ましい具体例は、当該技術分野において知られるごとく脳-血管閥門を通過する錯体を利用する。かくして、当該技術分野において知られるごとく、中性DOTA誘導体を形成するためにアルコールによって置換された1つのカルボン酸を有するDOTA誘導体は、脳-血管閥門を通過することが示された。かくして、例えば、中性錯体は、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンを検出するブロッキング基を持ち、脳-血管閥門を通過するように設計される。これらの化合物は、アルツハイマー病を含めた様々な神経障害のMRIにおいて用いられる。現在、アルツハイマー病を正確に診断するのは困難であり、アルツハイマー病を、例えば、うつ病または他の治療可能な臨床症状から区別するための生理学的基礎を有することができるのは有用であろう。

#### 【0170】

以下の実施例は、上記の発明を用いる方法をより十分に記載するため、ならびに本発明の種々の範囲を行うことにつき企図されたベストモードを記載するために供する。これらの実施例は、この発明の真の範囲を決して限定するものではな

く、例示的目的につき示すと考えられる。ここに、引用された文献を出典明示して本明細書の一部とみなす。

### 【0171】

#### 実施例

#### 実施例 1

##### ガラクトース-DOTA誘導体の合成およびキャラクタリゼーション

D<sub>0</sub>3 $\alpha$ -ヒドロキシエチル-ペータ-ガラクトース=ガドリニウム錯体の合成(図4): アセチル保護プロモ-ガラクトース(Aldrich)をプロモエタノールと反応させた。該アセチルガラクトースの様々な比率のアルファ-およびペータ-エーテルが良い収率で得られた。異性体をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて分離し、該アセチル保護基を加水分解し、およびプロトンNMRカップリング定数を既知の化合物と比較することによってそれらの帰属を行った。近年、X線構造がこれらの帰属を確認した(データ示さず)。

### 【0172】

該ペータ異性体を、該反応をTLCによりモニターしつつ、クロロホルム中で、還流にてcyclenと反応させた。該アセタートの加水分解を、TEA/MCOH/H<sub>2</sub>Oで一晩達成させ、溶媒を低真空下で除去した。得られた生成物を直接プロモ酢酸と反応させ、次いで、該pHが一定になるまで、pH10-10.5に維持した。全ての可能性のある生成物は、酢酸アンモニウムバッファー中で様々な電荷を有し、かくして、陰イオン交換クロマトグラフィーによって分離された。酢酸アンモニウム勾配をFPLC陰イオン交換の間中用いて、218nmにて検出しつつ、所望する化合物を溶出させた。80℃にての水中のガドリニウム酸化物を用いて、該金属を該錯体に挿入した。該反応を蛍光分光分析を用いて追跡した。該生成物を、検出に蛍光分光分析を用いるHPLC逆相クロマトグラフィーによって精製し、高分解能質量分析を用いて該構造を確認した。この本質的ワンポット合成の全収率は25%より高かった。

### 【0173】

アセト-1-エチルプロモ- $\beta$ -ガラクトースの合成(図3): 1-プロモエタン-2-オールを2,3,4,6-アセト-1- $\alpha$ -プロモ-ガラクトースと反応させて、アセ

ト-1-エチルプロモ- $\beta$ -ガラクトースの $\alpha$ および $\beta$ アノマーの混合物(10/90)を68%の収率(8.3g)にて生成した。精製 $\beta$ アノマーをフラッシュクロマトグラフィーを用いて得ることができた。該 $\beta$ アノマーのX線結晶構造により、立体化学的帰属を行った。

#### 【0174】

アセト-1-エチルプロモ- $\beta$ -ガラクトースをcyclen(Aldrich Chemical Co.)と反応させて、一置換生成物を生成した。該アセター保護基を切除し、pH10.5にてプロモ酢酸を用いて、該3カルボン酸置換基を付加した。該生成物を、蛍光分光分析によって観察する陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー(FPLC)によって、37%の収率にて単離した。Gd<sup>3+</sup>またはTb<sup>3+</sup>を該錯体に挿入し、水/アセトニトリル勾配(0-10%)を溶出液として、蛍光を検出(274nm-ex, 315nm-em)に用いる逆相HPLC分析C<sub>8</sub>。カラム上での繰返し収集を用いて70%の収率にて精製した。該固体の高分解能質量分析は(M+Na)<sup>+</sup>に対する親分子イオン与え、それは正しい正確な質量および予想された同位体比を示した。

#### 【0175】

別の合成経路: Do3aメチルエステルを文献の方法によって合成した。Do3aメチルエステルを、当該反応を塩基性pHに維持しつつ、D<sub>2</sub>O/d4メタノール中で記載されたごとく得られたアセチルガラクトースのペータ-プロモエチルエーテルと反応させた。該反応をNMRによって追跡した。まず、該酢酸メチルエステルが開裂し、該糖は、該メタノールを蒸発させることによって判断されたごとく水溶性になった。次に、該メチルエステルを吸収して切断し、最後に、pH10程度にて該糖Do3aの生成に一致するシフトが観察された。

#### 【0176】

Do2a-ヒドロキシエチル- $\beta$ -ペータ-ガラクトースの合成の概要: クロロホルム中において、cyclenと該アセチルガラクトースのペータ-プロモエチルエーテルとの反応を行った。該反応混合物をシリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製した。図5に示すごとく、該アルファ異性体は一置換のみを与えたが、該ペータ異性体に関して、二置換生成物が得られた。酢酸誘導化された腕を上記一置

換化合物に記載したごとく付加し、酸水勾配を用いるFPLC陽イオン交換によって精製した。個々の画分をTLCスポットティングによって検出した。

### 【0177】

キャラクタリゼーション：該ガラクトピラノースブロック基をGadGalから除去する $\beta$ -ガラクトシダーゼの能力をHPLCによって調べた。該切除反応を、該錯体および該ガラクトピラノースのない錯体の明確な保持時間を用いてモニターした。天然の $\beta$ -ガラクトシダーゼとのインキュベーションにより、15分の溶出時間で、ガラクトピラノースなしの錯体に対応するピークが出現した。熱不活性化ベータ-ガラクトシダーゼを用いた対照実験において、該ピーク保持時間は一定に保たれた。かくして、該HPLC実験は、天然の酵素によるが、熱処理された酵素にはよらない錯体の酵素的プロセッシングを確認した。

### 【0178】

該錯体の水交換速度に対する該ガラクトピラノース残渣の存在の効果、水/重水混合物中でテルビウム( $Tb^{3+}$ )誘導体の蛍光スペクトル(545nm)を測定することによって試験した。キレート化されたときのより強い蛍光信号および長い寿命のため、テルビウムをGdの代りに置換した。該テルビウム錯体の蛍光は、 $H_2O$ により消光されたが、 $D_2O$ によっては消光されなかった。この効果は、テルビウムの励起状態はOH振動子とは結合するが、DO振動子とは結合しないために起こる。従って、該蛍光信号の寿命は $H_2O$ 中よりも $D_2O$ 中の方が長い。 $1/\text{寿命} \text{ 対 } H_2O \text{ のパーセンテージ}$ のプロットは、該錯体と高速交換される水分子の数 $q$ の計算を可能にする [Kumarら, Pure and Appl. Chem. 65:515-520 (1993); Lieら, J. Am. Chem. Soc. 117:8123-8138 (1995); Zhangら, Inorg. Chem. 31:5597-5600 (1992)]。ガラクトピラノースの存在下および不存在下のテルビウム錯体の $q$ 値は、それぞれ、0.7および1.2であった。従って、分光蛍光分析は、該ガラクトピラノースブロック基が水の高速交換を妨げることを確証する。

### 【0179】

該錯体の $T_1$ に対するガラクトピラノースの酵素切除の効果をNMR分光分析を用いて評価した。これら $T_1$ 値に関連するモル量は緩和度 $R$ である。500M

HzでのR値を、錯体プラスガラクトース( $1800\text{mMs}^{-1}$ )およびマイナスガラクトース( $2400\text{mMs}^{-1}$ )につき測定し、関連する種のProhance( $2700\text{mMs}^{-1}$ )のそれと比較した。観察された緩和度における差異は、錯体T<sub>1</sub>測定から得られた結果に似ている。該分光蛍光分析実験において明示された水交換の増大は、該剤の溶液のT<sub>1</sub>が酵素的プロセッシングにより減少すべきことを示している。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの存在下および不存在下における実測T<sub>1</sub>値間の20%の差異がこの予想を確認した。2つの異なる濃度にて $\beta$ -ガラクトシダーゼに暴露された錯体は、溶液T<sub>1</sub>において同一であって、顕著な減少を示した。該錯体からのガラクトピラノースの切除に伴い観測されたT<sub>1</sub>における20%の変化は、蛍光測定で得られた実測水和数qと一致する。熱不活性化酵素と共に錯体の対象溶液は減少を示さず、実際に、T<sub>1</sub>は若干増大したようであった。MRI顕微鏡を用いて、ガラクトースの存在下および不存在下における錯体のT<sub>1</sub>の観測差異がMRIコントラスト剤として充分に機能するかどうかを調べた。標準反転回復系列を用いて得た像は、酵素的プロセッシングによって生じたT<sub>1</sub>変化をMR像中で可視化し得ることを明らかにした(図9)。該錯体を、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの有無のいずれかで1.5-1.8mmキャピラリーチューブに入れた。図9に表示された像は、T<sub>1</sub>媒介コントラストは $\beta$ -ガラクトシダーゼの作用により変えられ、該像コントラストに予想される増大をもたらした。

## 【0180】

### 実施例2

#### BAPTA-DTPAおよびBAPTA-DOTA誘導体の合成

BAPTA-DTPAの合成につき、2つの代表的な合成スキームを図7および8に示す。図7(好ましい方法)において、構造Iを公開された手順(Tsienら、同上)の修飾によって調製し、乾燥メタノール中のNaCNBrH<sub>3</sub>を用いてヘキサメチレンジアミンと結合させた。用いた反応物の比率は6:1:0.6(ジアミン:BAPTAアルデヒド:NaCNBrH<sub>3</sub>)であった。該反応を濃HClの添加により停止し、生成物をHPLC(II)によって精製した。この物質を、Gd(III)Cl<sub>3</sub>またはGd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を添加した後まで(上昇させたPH、加熱)BAPTA上に残留した保護基と共に、DTPAのモノ(またはビス)無水物と反応させた。最

終生成物をイオン交換HPLCによって精製した。

### 【0181】

図8において、DTPAのモノ無水物を調製し、ビスアルキルアミン(例えば、 $\text{N}(\text{H}_2(\text{CH}_2)_6(\text{NH}_2))_2$ )と反応させた。この物質をイオン交換HPLCで精製し、アルゴンインレットおよび均圧ロート(pressure equalizing funnel)を備え付けた丸底フラスコに入れた。乾燥メタノール中のBAPTAアルデヒドを乾燥メタノール中のアルキルアミン-DTPAの溶液に滴下し、6当量の $\text{HCl}:\text{MeOH}$ を添加した。該反応混合物をHPLCによって精製し、上記のごとくGd(III)を入れ、該保護基を文献の方法により除去した。

### 【0182】

#### 実施例3

##### 信号増大のためのR基の使用

実施例1の化合物は、標的する分析物(この場合は $\beta$ -ガラクトシダーゼ)に暴露することによりおよそ20%の増大を示した。MRコントラスト促進を増大させるために、本発明者らの意図は、大環状フレームワーク上部にガラクトピラノース単位の位置を安定化することによって、バルク水の該Gd(III)へのアクセスをさらに減少させることにある。テトラアザカルボキシリック大環における分子内動的プロセスを扱ういくつかの研究が、近年、報告された〔Kangら, *Inorg. Chem.*, 36:2912 (1993); Aimeら, *Inorg. Chem.*, 36:2095 (1997); Pittetら, *J. Am. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1997, 895-900; Spirletら, *J. Am. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1997, 497-500〕を参照。これらの全ては出典明示して本明細書に含まれる)。この研究は、 $\alpha$ -メチル基をカルボキシリック腕のエチレン基に導入することが、該アミノ-カルボキシラート大環状フレームワークの剛直性を増大させることを明らかにした。従って、本発明者らは、立体的に高い $\alpha$ -メチル基を2つの別々のサイトに付加して、2つの新たな化合物を生成した。第1は「EGADMe」であって、ガラクトシルブロッキング部位を含有するDOTA腕上の単一のメチル基を持つ実施例1のGADGALである。第2は「カルボキシMe」であって、ガラクトシルブロッキング部位を含有する腕を放し、他の3つのDOTA腕上に3つのメチ

ル基を持つ実施例1のGADGALである。最終生成物、EGadMeおよびカルボキシMeならびに中間体をNMRおよび質量分析によりキャラクタライズした。

### 【0183】

EGadMeおよびカルボキシMeからのガラクトピラノースブロッキング基の酵素的切除が成功し、および完了し、それぞれ、EGadMecIおよびカルボキシMecIを生成したことを、TLCクロマトグラフィー(20mM トリスアセテート、10mM EDTAバッファー、pH7.0、0.8%アセトニトリル中のC18逆相プレート)によって追跡した。0.5mM EGadMeおよび5 $\mu$ M  $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する水溶液中で37℃にて3日以内に90%のガラクトピラノース単位が酵素的にEGadMeから切除されたが、カルボキシMeにつき、同一の条件下で24時間の期間内に、同一の効果が観察された。この結果は、カルボキシMeのガラクトピラノース単位はより露出され、酵素に接近し易く、従って、より高い切除速度をもたらすことを暗示している。

### 【0184】

緩和時間T1に対する、EGadMeおよびカルボキシMeからのガラクトピラノース単位の酵素的切除の効果を500MHzで24℃にてNMR分光分析によって測定した。(a)酵素なし；(b)80℃にて10分間処理した加熱不活性化した5 $\mu$ M  $\beta$ -ガラクトシダーゼ；(c)T1を混合後即座に測定する5 $\mu$ M  $\beta$ -ガラクトシダーゼ；または(d)3.5日間37℃にて、該錯体と反応させた5 $\mu$ M  $\beta$ -ガラクトシダーゼのいずれかを含有する0.5mM EGadMeおよびカルボキシMeの種々の水溶液を、それぞれ、調製した。EGadMeを含有する溶液およびEGadMecIeを含有する溶液のT1間の顕著な差異は明らかに明白である。EGadMecIの存在下、水プロトンのT1は、EGadMeを含有する溶液を基準に55%増大する。これらの結果は、EGadMeは、高度に効果的、機能的、すなわち「スマート」なMRIコントラスト剤であることを示す。非切除および切除状態間のT1における大きな差異はin vivo適用に対する決定的な因子を表す。予備的in vivo研究は、該化合物がこれらの高い期待を満たすことを示している。

## 【0185】

興味深いことに、カルボキシMeを含有する溶液(a)～(d)について、T1の顕著な変化は検出されなかった。しかしながら、全てのカルボキシMeにつき測定されたT1値は、EGadMeclを含有する溶液につき得られたそれらと非常に似ている。水プロトンの緩和時間はカルボキシMeおよびカルボキシMeclにつき、同じ桁の大きさなので、ガラクトピラノース単位は該Gd(III)サイトをブロックしないものと思われる。従って、それはバルク水が該金属サイトに接近することを制限することにおいては効果的でない。

## 【0186】

分子モデリング研究がこの仮定を支持する。EGadMeおよびカルボキシMeの計算コンフィギュレーションを評価した。EGadMeにおいて、該ガラクトピラノース単位を大環状フレームワークの上部に配置し、それによって、該金属中心を遮蔽した。該ガラクトピラノース単位を切離したとき、該金属サイトは容易に露出され、バルク水に接近してGd(III)配位球を完成する。しかしながら、カルボキシMeで、該ガラクトピラノース単位は、該環状単位の上部に位置する代りにそれから離れて正対している。該カルボキシリック腕に対する該 $\alpha$ -メチル基の立体的影響は、ガラクトピラノース単位がGd(III)サイトの上部に位置しないようにするようである。従って、該金属サイトは、非切除状態において、切除状態と同様に容易にバルク水分子に接近し、両構造につき同等のT1データをもたらす。さらに、カルボキシMeについての質量スペクトルは、2つの塩素アニオンが該2つの空隙Gd(III)配位サイトを完全に分子に配位されていることを明らかにする。EGadMeにおいて、これらの配位サイトはガラクトピラノース単位によって満たされている。

## 【0187】

水分子のGd(III)への接近をブロックするガラクトピラノース単位の効率を決定するために、それによってEGadMeの水交換速度をモニターする、対応するテルビウム誘導体(ETbMe)の蛍光信号寿命を調べた。テルビウムは該OH振動子と強く結合するので、該テルビウム錯体の蛍光をH<sub>2</sub>Oによって消光する。この効果は、OD振動子に関しては観察されない。結果として、該蛍光信号

の寿命は、 $\text{H}_2\text{O}$ 中よりも $\text{D}_2\text{O}$ 中が長い。種々の $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 混合物において  $\text{ETbMe}$  を測定し ( $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$ )、得られた寿命対該 $\text{D}_2\text{O}$ 濃度をプロットして、該錯体と高速交換する水分子の数  $q$  を導く ([Kumarら, *Pure Appl. Chem.* 65:515-520 (1993); Liら, *J. Am. Chem. Soc.* 117:8132 (1995); Horrocksら, *J. Am. Chem. Soc.* 101:334 (1979); Zhangら, *Inorg. Chem.* 31:5597 (1992)] を参照。これら全ては出典明示して本明細書に含まれる)。  $\text{ETbMe}$  につき値  $q = 0.6$  が決定され、それを、テトラ酢酸大環状  $\text{Gd-DO3A}$  ([Lauffer, *Chem. Rev.* 90:1-927 (1997)] を参照。) につき観察された値  $q = 1.2$  と比較した。配位している水分子の数の変化は明らかに明白である。対応する切除された錯体、 $\text{ETbMecl}$  につき、該蛍光信号の対数減衰はより速く、数  $q < 1$  を示す。しかしながら、 $\text{ETbMecl}$  につき  $q$  を正確に決定する試みは、蛍光測定装置の時間分解能によって制限された。

#### 【0188】

$\text{EGadMecl}$  につき数  $1 < q < 2$  を仮定することは、 $\text{EGadMe}$  および  $\text{EGadMecl}$ 、および  $\text{EGadMecl}$  中のヒドロキシ基が該金属サイトにきつくは配位しない構造的配置につき観察された  $\text{T1}$  データと総合的に合致する。理論は、 $q$  の増大は  $\text{T1}$  の増大に関連すると予測する。従って、 $\text{T1}$  における 55% の大きな差異は相乗効果であると仮定し得る。例えば、 $\text{EGadMe}$  におけるガラクトピラノースによる該金属サイトのバルク水の接近を効率的にブロックし、 $\text{EGadMecl}$  において該錯体と高速交換する水分子の数を  $1 < q < 2$  と仮定する。

#### 【0189】

##### 実施例 4

$\text{Gd}^{3+}$ -BAPTA- $\text{DO3A}$  ( $\text{Ca1Gd}$ ) の合成

$\text{Ca1Gd}$  の合成スキームを図 14 に示す。

#### 【0190】

化合物 1: 2-ニトロレソルシノール (2 g, 12.9 mmol) を 95% エタノール (15 mL) に溶解し、1 当量の  $\text{NaOH}$  をゆっくり添加した。添加後、溶媒を

真空乾燥下で除去し、得られた固体を4 mL DMFに1当量の3-プロモプロパノールと共に再溶解した。該溶液を100℃にて7時間加熱した後、反応を数滴の酢酸で停止した。溶媒を真空下で除去した後、残渣を塩化メチレンに懸濁させ、濾過した。フラッシュクロマトグラフィー( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、20:1)により、1.08 g (42%)の1を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.14 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ )、3.94 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ )、4.26 (t,  $\text{OCH}_2$ )、6.6 (d, 1H, 芳香族H)、6.72 (d, 1H, 芳香族H)、7.41 (t, 1H, 芳香族H)。

#### 【0191】

化合物2: 化合物1 (0.8 g, 3.76 mmol)を8 mL DMFに溶解した。次いで、1,2-ジプロロエタン(0.16 mL, 1.88 mmol)および $\text{K}_2\text{CO}_3$ (0.28 g)を添加し、該混合物を120℃にて10時間加熱した。反応を数滴の酢酸で停止し、溶媒を真空下で蒸発させた。残渣をフラッシュクロマトグラフィー( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、20:1)によって精製し、0.46 gの生成物(55%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.0 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ )、3.85 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ )、4.25 (t, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$ )、4.46 (s, 4H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ )、6.66 (m, 4H, 芳香族H)、7.4 (t, 2H, 芳香族H)。

#### 【0192】

化合物3: 化合物2 (0.15 g)を酢酸エチル(10 mL)および95%エタノール(10 mL)の混合物中に懸濁させた。パラジウム触媒(Pa/炭素、10%、50 mg)を添加した後、該溶液を1気圧にて一晩水素添加した。残渣を直接次のステップに用いた。

#### 【0193】

化合物4: 上記の残渣をアセトニトリル(2 mL)、DIEA(0.25 mL, 1.37 mmol)および酢酸プロモエチル(0.15 mL, 1.37 mmol)と混合した。溶液をアルゴン下で24時間還流し、次いで、室温まで冷却した。トルエン(20 mL)を添加して、DIEA塩を沈殿させた。該沈殿を濾別した後、濾液をフラッシュクロマトグラフィー( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、20:1)上で精製し

、0.15 gの生成物(2ステップで61%)を得た。

MS(エレクトロスプレー)m/z (M+H)<sup>+</sup>、計算値: 737 (C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>)

、測定値: 737.6、759.4 (M+Na)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR(CDC l<sub>3</sub>): 1.25 (t, 12H, CH<sub>3</sub>), 2.08 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.9 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OH), 4.05–4.4 (m, 24H), 6.62 (t, 4H, 芳香族H), 7.0 (m, 2H, 芳香族H)。

#### 【0194】

化合物5: 化合物4 (245 mg, 0.33 mmol)、トリフェニルホスフィン(262 mg, 1 mmol)および四臭化炭素(332 mg, 1 mmol)をジエチルエーテル(3 mL)に溶解した。室温にて40分間攪拌した後、フラッシュクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>ないしCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1)精製により0.19 gの生成物(67%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR(CDC l<sub>3</sub>): 1.21 (t, 12H, CH<sub>3</sub>) 2.34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.67 (t, 4H, CH<sub>2</sub>Br), 4.05–4.34 (m, 24H), 6.62 (m, 4H, 芳香族H), 7.0 (m, 2H, 芳香族H)。

#### 【0195】

化合物6: 化合物5 (42 mg, 49 μmol)をCHCl<sub>3</sub> (0.5 mL)中でcyclen (43 mg, 0.25 mmol)と30時間反応させた。フラッシュクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>・H<sub>2</sub>O 12:4:1)により透明ガラス状の生成物を得た(41 mg, 80%)。

MS(エレクトロスプレー)m/z (M+H)<sup>+</sup>、計算値1046 (C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>)、測定値1046.0 (M+H)<sup>+</sup>、1067.8 (M+Na)<sup>+</sup>、1089.8 (M+2Na-H)<sup>+</sup>、523.4 (M+2H)<sup>2+</sup>、534.4 (M+H+Na)<sup>2+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR(CDC l<sub>3</sub>): 1.2 (t, 12H, CH<sub>3</sub>) 2.0 (br, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.6–2.85 (br, 3.6H), 4.0–4.4 (br, 2.4H), 6.64 (br, 4H, 芳香族H), 6.95 (br, 2H, 芳香族H)。

#### 【0196】

化合物7: 化合物6 (38 mg, 38 μmol)をH<sub>2</sub>O (0.2 mL)中プロモ酢酸(37 mg, 266 μmol)と混合した。水酸化ナトリウム(SN)をゆっくり

と添加して、該溶液のpHを10以上に維持した。該溶液のpHが安定に達したら、該反応を少量の酢酸で停止した。生成物を逆相クロマトグラフィー(LiChroprep RP-18、 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 、5%–50%)によって精製し、凍結乾燥後、38mg(82%)の白色粉末を得た。

MS(エレクトロスプレー)m/z(M+H)<sup>+</sup>、計算値1280( $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_8$ )、測定値1279.4(M+H)<sup>+</sup>、639.3(M-2H)<sup>2+</sup>；

<sup>1</sup>H-NMR( $\text{D}_2\text{O}$ ): 2.32(b r, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ )、3.05–3.83(b r, 48H)、4.05(s, 8H)、4.27(b r, 4H)、4.7(s, 4H) 6.8(d, 2H, 芳香族H)、6.95(d, 2H, 芳香族H)、7.4(t, 2H, 芳香族H)。

#### 【0197】

化合物7の $\text{Gd}^{3+}$ -錯体：上記配位子(化合物6、16.5ma、12.9 $\mu\text{mol}$ )を $\text{GdCl}_3$ (10.6ma、28.4 $\mu\text{mol}$ )を含有する $\text{H}_2\text{O}$ (0.5mL)に溶解した。 $\text{NaOH}$ (1N)をゆっくり添加してpHを5–6程度に維持した。該溶液のpHが2h以内に安定に達し、反応の完了を示した。該混合物をChelexレジン(Biorad, Chelex 100,  $\text{Na}^+$  form)を充填したカラムに通し、該生成物を含有する画分を逆相クロマトグラフィー(LiChroprep RP-18、 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 、5%–50%)によってさらに精製した。最終生成物を白色粉末として得た(17ma、81%)。

MS(エレクトロスプレー)m/z(M+H)<sup>+</sup>、計算値1583–1597( $\text{C}_{38}\text{H}_{37}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{Gd}$ 、1590 最大存在率)、測定値(該最大存在率のピーク)1611.4(M-2H+Na)<sup>+</sup>、1633.2(M3H+2Na)<sup>+</sup>、804.8(M-3H+Na)<sup>2+</sup>、793.6(M-2H)<sup>2+</sup>。

#### 【0198】

錯体の緩和度に対する $\text{Ca}^{2+}$ の効果

$\text{Ca}^{2+}$  存在下、 $R=5.53\text{mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$

$\text{Ca}^{2+}$  不存在下、 $R=3.03\text{mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$

#### 【0199】

錯体の緩和度に対するpHの効果

$\text{Gd}^{3+}$ -錯体(100mM KCl、10mM MOPS、2mM  $\text{K}_2\text{H}_2\text{EGT}$

Aまたは2mM  $K_2CaEGTA$ を含有するバッファー中0.4mM)のT1を種々のpH下で測定した。 $Ca^{2+}$ の存在下または不存在下のいずれかにおいて、0.2pH単位毎で6.80から7.40までpHを変化させることは、錯体の緩和度に最小限の効果を有していた。

#### 【0200】

pH	6.80	7.00	7.20	7.40
T1(msec, $K_2H_2EGTA$ )600	605	604	608	
T1(msec, $K_2H_2EGTA$ )390	393	394	397	

#### 【0201】

錯体の緩和度に対する $Mg^{2+}$ の効果

$Gd^{3+}$ —錯体(132mM  $KCl$ 、10mM MOPS、1mM  $K_2H_2EGTA$ を含有するバッファー中0.4mM、pH7.20)のT1を測定した。0から20まで $Mg^{2+}$ 濃度を変化させることは、錯体の緩和度に最小限の効果を有していた。

#### 【0202】

$Mg^{2+}$ (mM)	0	1	2	5	10	20
T1(msec)	607	602	601	609	607	610

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

図1は、ブロッキング基が1端のみにて束縛される本発明の代表的な錯体を示す。ブロッキング基は、酵素基質および配位部位バリアーを含む。R基は、配位部位バリアーである。

#### 【図2】

図2は、ブロッキング基が2つの端にて束縛される本発明の代表的な錯体を示す。R基は、配位部位バリアーである。

#### 【図3】

図3は、DOTA環に結合した単一のガラクトース基を有するDO3a-ヒドロキシエチル- $\beta$ -ガラクトースの代表的合成を示す。

#### 【図4】

図4は、DOTA環に結合した2つの $\beta$ -ガラクトース基を有するを有する $\beta$ -ガラクトース-DOTA誘導体の代表的合成を示す。

【図5】

図5は、BAPTA-DOTA誘導体の合成を示す。

【図6】

図6は、FURA-DOTA誘導体の合成を示す。

【図7】

図7は、BAPTA-DTPAの合成についての合成反応図式を示す。

【図8】

図8は、BAPTA-DTPA誘導体の代表的合成を示す。

【図9】

図9は、ガラクトピラノース残基( $n=3$ )の $\beta$ -ガラクトシダーゼ触媒切断の際に観察された $T_1$ における変化を示す。各対(1, 3, 5)の第一カラムは、添加直後のガラクトース-DOTA錯体および $\beta$ -ガラクトシダーゼ混合物の $T_1$ を示す。第二カラムは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの存在下でのある時間後の溶液の $T_1$ を示す。各カラムは、該錯体のみを含有する対照に対する比を報告する。カラム1および2: 2.0 mM Gd錯体プラス1.7  $\mu$ M  $\beta$ -ガラクトシダーゼリン酸緩衝液(25 mM) pH 7.3。カラム3および4: 2.0 mM Gdプラス5.1  $\mu$ M  $\beta$ -ガラクトシダーゼリン酸緩衝液(25 mM) pH 7.3。カラム5および6: 2 mM Gd錯体プラス5.1  $\mu$ M熱不活性化 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(80度にて10分間)リン酸緩衝液(25 mM) pH 7.3。該錯体は、7日間酵素と共にインキュベートし、HPLCトレースは、95%を超える切断を示した。最小濃度の酵素をこれらの実験に用いて、いずれかのコントラスト剤-酵素相互作用の潜在的効果を低下させた。 $T_1$ は、標準的反転-回復系列を用い、26度にてBruker AMX 500分光計を用いて行った。溶液は、40  $\mu$ l丸底NMR試験管挿入(Wilmad glass)に入れ、 $d_5$ -クロロホルムを含む試験管に挿入した。二次元データファイルは集められ、8つのスキャン毎に16個の異なる反転遅延を含んだ。生のNMRデータは処理され(Felix, BIOSYM/Molecular Simulations, San Diego, CA)、ピーク高は、最大

まで指数関数的な上昇に適合させて、 $T_1$ を得た。 $R$ 値は、常に0.999より大きかった。

#### 【図10Aないし10I】

図10A、10B、10C、10D、10E、10Fおよび10Gは、二量体具体例のいくつかの可能な立体配置を示す。箱はキレート化剤を示し、Mは常磁性金属イオンである。図10Aおよび10Bは、2つの可能なデュプレックス立体配置を示す。図10Aにおいて、 $R_{22}$ は、 $R_{23}$ として本明細書に記載されたときリンカーであり、ペプチドのような酵素基質のごとき切断基、または標的分子と優先的に相互作用するであろうブロッキング基であり得る。 $R_{22}$ に依存して存在できるかまたはできない $R_{22}$ は、 $R_{23}$ と同様の配位部位バリアー、またはブロッキング基である。図10Bは、2つのキレート化剤に、 $R_{22}$ 基を介して結合した $R_{23}$ ブロッキング基または配位部位バリアーを示す。図10Cは図10Aと同様であるが、少なくとも一つの $R_{22}$ 基が切断基でなければならない。図10Dは、2つのブロッキング基または配位部位バリアーが存在し、 $R_{22}$ がブロッキング基ならば、 $R_{23}$ は存在する必要はない場合を示す。図10Eは、10Bと同様であるが、キレート化剤が共有結合する必要はない。図10F(単一MRI剤)および10G(デュプレックス薬剤)は、 $n$ は1ないし1000、好ましくは1ないし約20、特に好ましくは約1ないし10であるMRIコントラスト剤の多重結合である。図10Hおよび10Iは、本明細書に記載のごときポリマー10を示し、単一MRI剤(10H)またはデュプレックスMRI剤(10I)のいずれかに結合する。

#### 【図11Aないし11C】

図11A、11Bおよび11Cは、各々、異なる $R_{22}$ リンカーを持ち、該ブロッキング基としてBAPTA誘導体を用いる $Ca^{2+}$ 検出用のMRIデュプレックスを作成する前駆体を示す。図11AはAEPaを示し、それは、Gdが存在する場合に0.7の $q$ を示す( $q$ は錯体に会合した水分子数であり、水の交換を遮断するためのブロッキング基の指標であり、 $q$ が低いほどより良好となる)。 $q$ 値は、 $D_2O$ および $H_2O$ 中に金属イオンとしてテルビウム( $Tb^{3+}$ )を用いる蛍光寿命測定を用いて測定される(データは示さず)。図11Bは、0.3の $q$ を有する

APPAを示す。図11Cは、0.7のqを有するABPAを示す。

【図12】

図12は、AEPAの合成を示す。当業者によって認められるごとく、すべてのデュプレックスは、ニトロベンジル環上の他のオルト位を官能化することによって作成できる。

【図13】

図13は、APPAおよびABPAの合成を示す。当業者によって認められるごとく、すべてのデュプレックスは、ニトロベンジル環上の他のオルト位を官能化することによって作成できる。

【図14】

図14は、 $Gd^{3+}$ -BAPTA-DO3A<sub>2</sub>(「Ca1Gad」)の合成を示す。

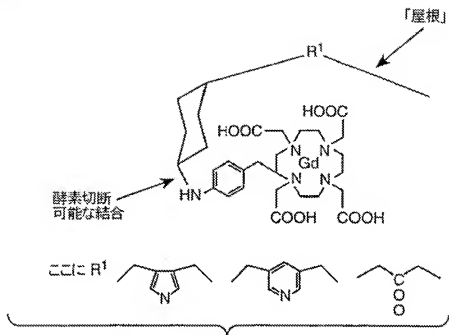
【図15】

図15は、カルシウムの結合に際して生じるCa1Gadにおける構造上の変化を概略的に示す。

【図16】

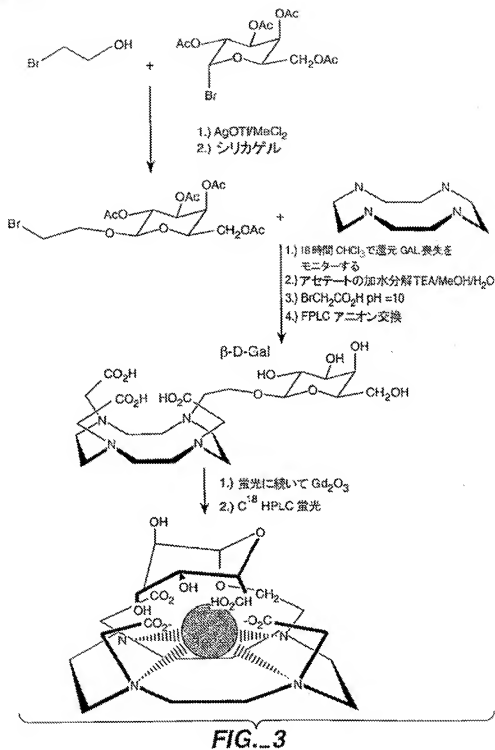
図16は、カルシウムイオン濃度の関数としてCa1Gad錯体の緩和度を示す。

【図1】





【図3】



【図4】

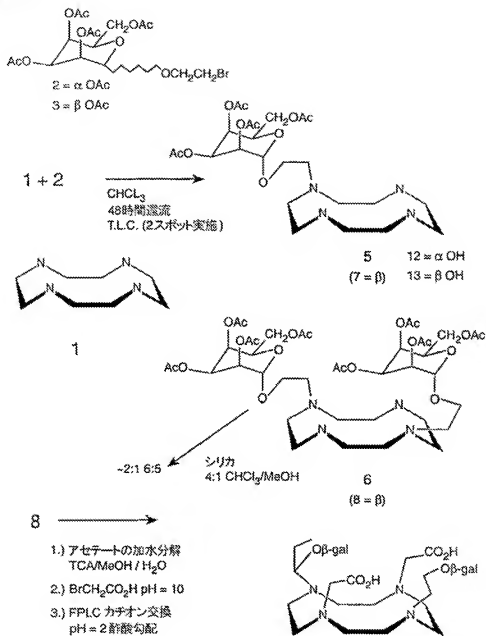
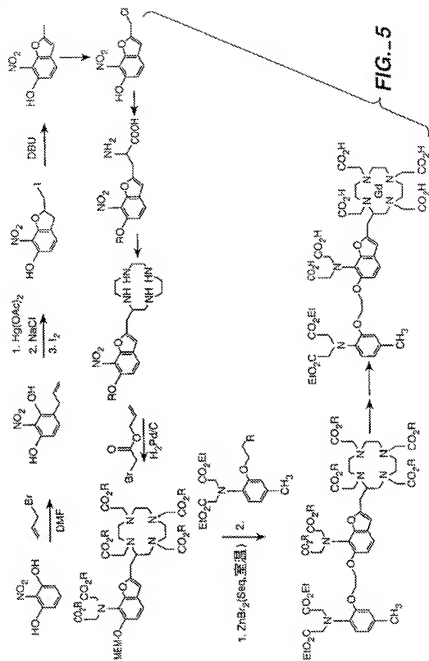


FIG. 4

【図 5】



【圖6】

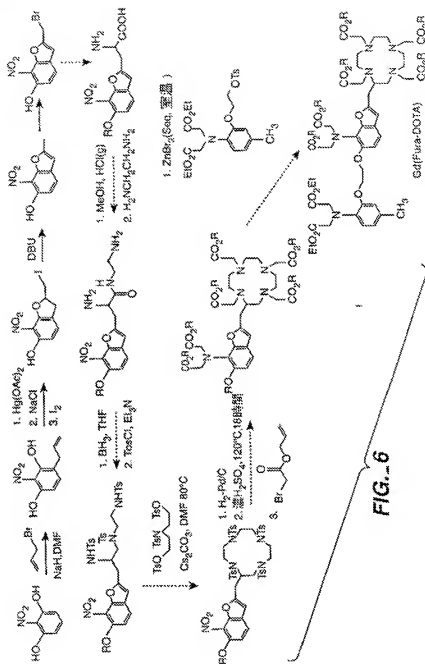


FIG. 6

【図 7】

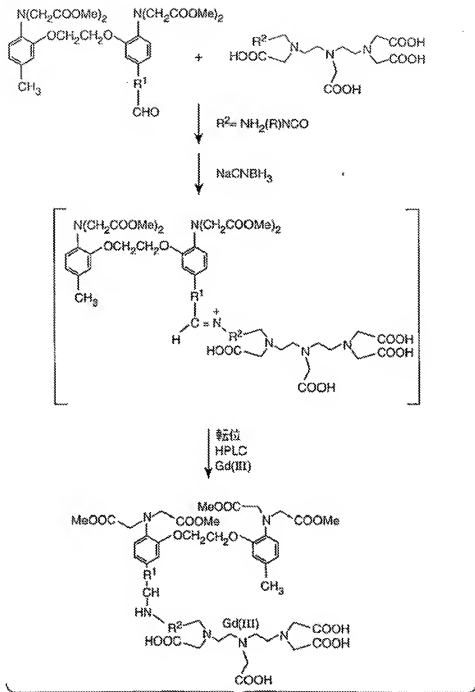
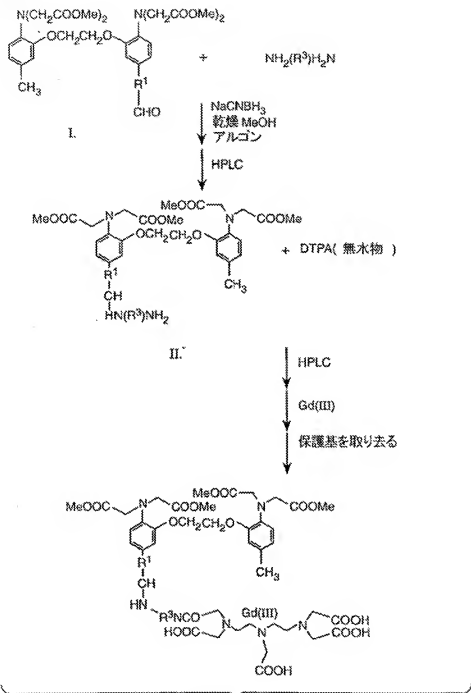


FIG. 7

【図8】



【図9】

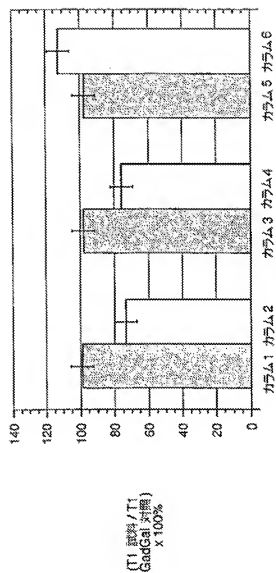
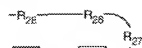
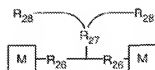
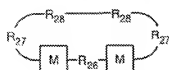
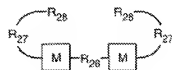
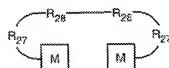
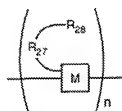
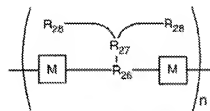
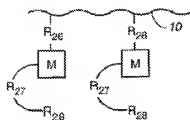
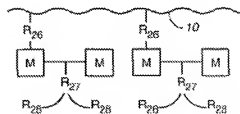
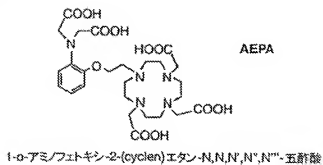
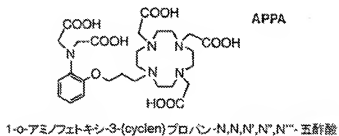
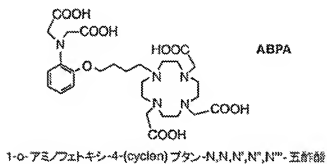


FIG.\_9

【図10A-I】

**FIG. 10A****FIG. 10B****FIG. 10C****FIG. 10D****FIG. 10E****FIG. 10F****FIG. 10G****FIG. 10H****FIG. 10I**

【図11A-C】

**FIG.\_11A****FIG.\_11B****FIG.\_11C**

【図12】

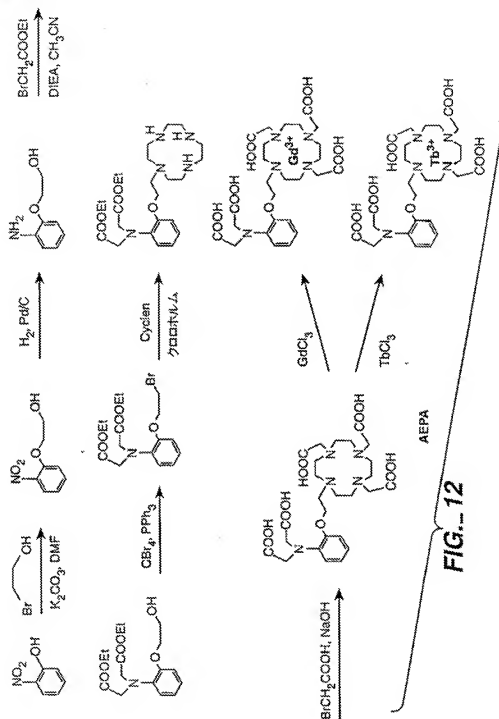
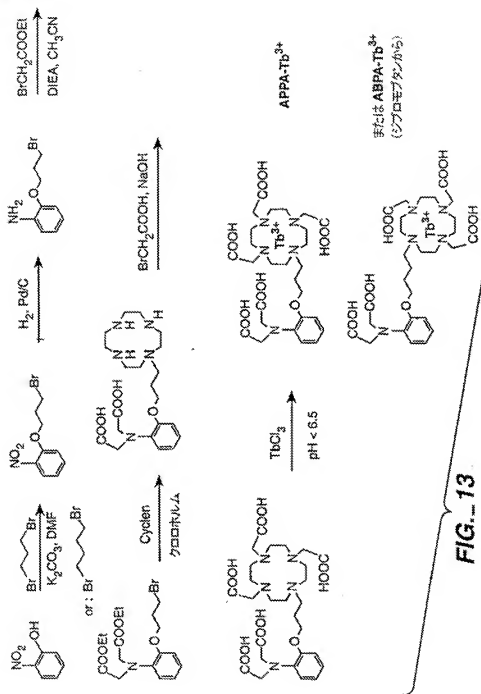
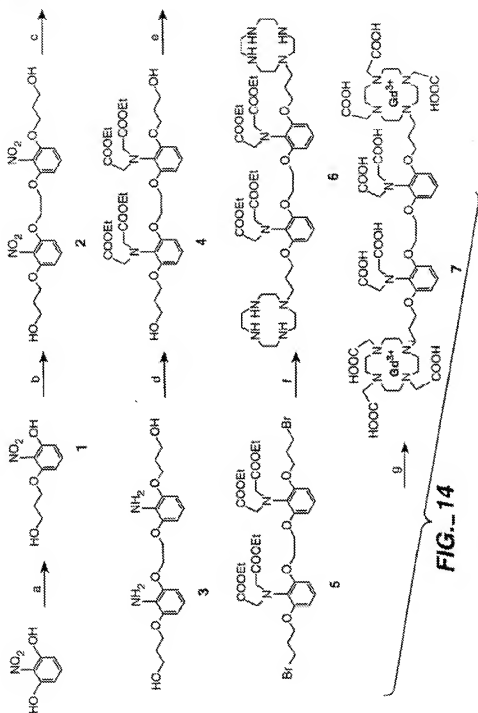


FIG. 12

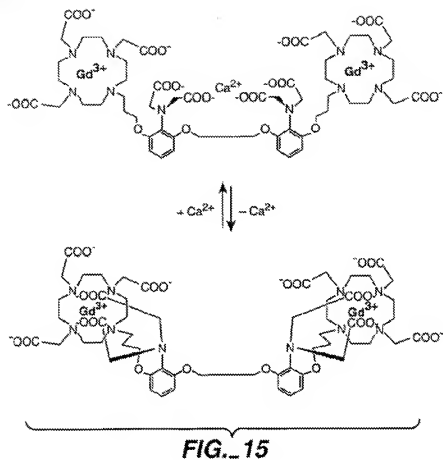
【図 13】



【図14】



【図15】



【図16】

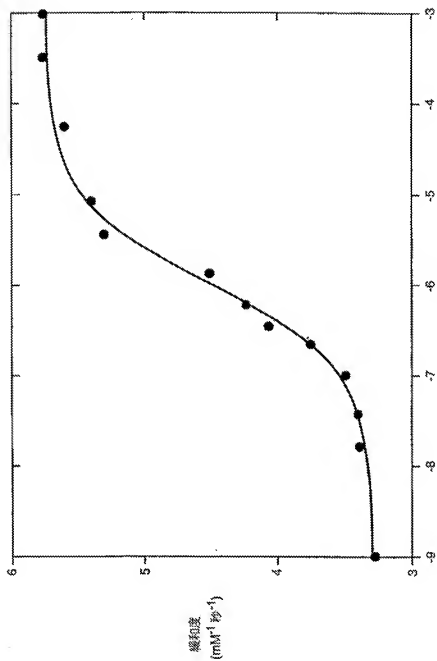


FIG. 16

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 98/24570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K49/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Magnetic Resonance Search Unit - International system followed by classification categories IPC 6 A61K	
Documentation searched other than inventors' documents in the states that such documents are required in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search phase of the search and, where practical, search terms used	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category <sup>1</sup>	Relevance to claim 10
T	LI, WEN-HONG ET AL.: "A Calcium-Sensitive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent" J. AM. CHEM. SOC. (1999), 121(6), 1413-1414, XP06215324 the whole document
E	WO 99 21592 A (CALIFORNIA INST OF TECH) 6 May 1999 (1999-05-06) page 30, line 28 - page 31, line 13 page 32, line 4-7
X	WO 96 38184 A (CALIFORNIA INST OF TECH ; READE THOMAS (US); FRASER SCOTT (US); JA) 5 December 1996 (1996-12-05) cited in the application page 45, line 5-9, figures
-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of item C1	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex
<p><sup>1</sup> "Brevets résumés" of the documents</p> <p>"a" document containing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"b" patent document published in or after the international filing date</p> <p>"c" document which may show grounds on priority documents which are cited to establish the prior art of the invention</p> <p>"d" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"e" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"f" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"g" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"h" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"i" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"j" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"k" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"l" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"m" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"n" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"o" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"p" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"q" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"r" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"s" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"t" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"u" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"v" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"w" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"x" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"y" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p> <p>"z" document which is not a disclosure, but, in whole or in part, is a disclosure of the invention</p>	
Date of the actual introduction of the international application	Date of filing of the international search report
15 September 1999	02.11.99
Name and mailing address of the ISA 2000000000 Office, P.O. Box 1000000000 PO, 1000000000 Tel: (+1) 703 546-0000, Fax: 2155-0000 Fax: (+1) 703 546-0010	Authorized officer Veronese, A

1 copy of PCT/US 98/24570 (search report) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 98/24570

II (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Character of document, article, patent, where appearance of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 27705 A (BRACCO INT BV) 19 October 1995 (1995-10-19)  claims; examples 12, 14	1-5, 11, 12, 14-16, 29, 31, 32
X	WO 95 31444 A (BRACCO INT BV) 23 November 1995 (1995-11-23)  claims; examples 1-6	1-5, 11, 12, 14-16, 29, 31, 32
X	WO 96 23526 A (SAJIKI HIRONAO; LAUFFER RANDALL B (US); MEJASYN INC (US); SCOTT DA) 8 August 1996 (1996-08-08) claim 2; examples	1-3, 5, 18, 29, 30, 33
X	WO 97 32862 A (BRACCO SPA; DIERRA SPA (IT); GOZZINI LUGIA (IT); MATSANO FEDERICO) 12 September 1997 (1997-09-12)  claims; examples 3-6, 16	1-5, 11, 12, 14-16, 29, 31, 32
Y		1-5, 11-29, 31-33
X	WO 97 36619 A (EPIX MEDICAL INC) 9 October 1997 (1997-10-09)  page 38, line 18 -page 39, line 22 claims 43-50; examples	1-3, 5, 18, 23-26, 29, 30, 33
X	MOATS REX A. ET AL.: "A "Smart" Magnetic Resonance Imaging Agent That Reports on Specific Enzymatic Activity" ANGEW. CHEM. INT. ED. ENGL., vol. 36, no. 7, April 1997 (1997-04), pages 726-728, XP002096505 the whole document	1-4, 6, 29, 30
Y		1-5, 11-29, 31-33
Y	RAJESH SHUKLA ET AL.: "DESIGN OF CONFORMATIONALLY RIGID DIMERIC MRI AGENTS" MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE, vol. 35, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 928-931, XP000594144 ISSN: 0740-3194 the whole document	1-5, 11-29, 31-33
Y	WO 96 05167 A (SCHERING AG; KRAUSE WERNER (DE); MAIER FRANZ KARL (DE); BAUER MICH) 22 February 1996 (1996-02-22) the whole document	1-5, 11-29, 31-33

-/-

PCT/US 98/24570 (Continuation of PCT/US 98/24570)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 98/24570

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with priority, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
Y	EP 0 661 279 A (GUERBET SA) 5 July 1995 (1995-07-05)  examples 7, 8 -----	1-5, 11-29, 31-33
Y	WO 95 28966 A (COCKBAIN JULIAN ;NYCOMED IMAGING AS (NO); CAMPION BRIAN (US); GARR) 2 November 1995 (1995-11-02) examples -----	1-5, 11-29, 31-33
Y	WO 90 12050 A (COCKBAIN JULIAN R M ;SALUTAR INC (US)) 18 October 1990 (1990-10-18) the whole document -----	1-5, 11-29, 31-33
X	WO 95 32741 A (BRACCO SPA ;DIBRA SPA (IT); ANELLI PIER LUCIO (IT); MAEM CHRISTOPH) 7 December 1995 (1995-12-07) the whole document -----	1-6, 29, 30
A	WO 97 21431 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 19 June 1997 (1997-06-19) the whole document -----	1, 29, 30

Form PCT/ISA(210) as amended by the first supplementary sheet (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 98/24570

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(b) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29-33  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although claims 29-33 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 10  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
See FURTHER INFORMATION SHEET PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 64(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International Application, as follows:

1. Claims: 1-5,29(part.),6-9,30(comp.). As far as not comprised in invt. 1 & 2  
2. Claims: 1-5,18,21-26,29,33(part.). As far as not comprised in invt. 1 & 3  
3. Claims: 1-5,18,21-26,29,33(part.),11-17,19,20,27,28,31,32(comp.). As far as not comprised in invt. 1 & 2
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effect justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, if it is covered by claims Nos.  
1-5,29(part.),6-9,30(comp.). As far as not comprised in invt. 1 & 2

Remark on Protest:

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP 98/24570

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA

1. Claims: 1-5, 29 (partial), 6-9, 30 (complete). As far as not comprised in inventions 2 and 3.

An MRI agent comprising:

- a) one Gd(III) ion bound to a chelator such that said Gd(III) ion has coordination atoms in at least 5 coordination sites of said Gd(III) ion.
  - b) a blocking moiety covalently attached to said chelator which hinders the rapid exchange of water in the remaining coordination sites, wherein said blocking moiety is capable of interacting with a target substance such that the exchange of water in the remaining coordination sites is increased.
- The MRI agent corresponds to the formula shown in claim 6.

2. Claims: 1-5, 18, 21-26, 29, 33 (partial). As far as not comprised in inventions 1 and 3.

A composition comprising a polymer comprising one covalently linked MRI contrast agent comprising a paramagnetic metal ion bound to a complex, said complex comprising:

- a) a chelator; and
- b) a blocking moiety covalently attached to said chelator which binds in at least a first coordination site of said metal ion and which is capable of interacting with a target substance such that the exchange of water in at least said first coordination site is increased.

3. Claims: 1-5, 18, 21-26, 29, 33 (partial), 11-17, 19, 20, 27, 28, 31, 32 (complete). As far as not comprised in inv. 1-2.

An MRI agent comprising:

- a) a first chelator and a first paramagnetic metal ion;
- b) at least a second chelator and at least a second paramagnetic metal ion;
- c) at least one blocking moiety, attached to one of said chelators, said at least one blocking moiety binding in at least a first coordination site of one of said metal ions, and which is capable of interacting with a target substrate such that the exchange of water in the first coordination site of said metal ion is increased.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 98/24570

FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM PCTISA/ 216

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 10

Claim 10 is obscure, R26 can not be depending from claim 6.

In view of the large amount of compounds, which are defined by the general definition in claims 1-26, the search had to be restricted for economic reasons. The search was limited to the compounds for which pharmacological data was given and/or the compounds explicitly mentioned in the application, and to the general idea underlying the application (see guidelines, Part B, chapter III, paragraph 3.6).

Claims partially searched: 1-26, 29-33.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/24570

Patent document classification report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO 9921592 A	06-05-1999	AU 1201799 A	17-05-1999
WO 9638184 A	05-12-1996	US 5707605 A	13-01-1998
		AU 5975196 A	18-12-1996
		CA 2222974 A	05-12-1996
		EP 0831928 A	01-04-1998
		NO 975517 A	19-01-1998
WO 9527705 A	19-10-1995	EP 0702677 A	27-03-1996
		JP 8511809 T	10-12-1996
		US 5573752 A	12-11-1996
WO 9531444 A	23-11-1995	CA 2164944 A	23-11-1995
		CN 1128534 A	07-08-1996
		CZ 9600085 A	12-06-1996
		EP 0708761 A	01-05-1996
		JP 9500660 T	21-01-1997
		NO 955115 A	05-03-1996
WO 9623526 A	08-08-1996	AU 689700 B	02-04-1998
		AU 4654396 A	21-09-1996
		BR 9607136 A	25-11-1997
		CA 2211100 A	08-08-1996
		CN 1172436 A	04-02-1998
		EP 0806968 A	19-11-1997
		FI 973183 A	31-07-1997
		JP 10513445 T	22-12-1998
		NO 973510 A	30-07-1997
		NZ 361191 A	25-02-1999
		ZA 9600417 A	08-08-1996
WO 9732852 A	12-09-1997	IT M1960A53 A	08-09-1997
		RU 2094697 A	22-09-1997
		EP 0685202 A	23-12-1998
WO 9736619 A	09-10-1997	AU 2544897 A	22-10-1997
		BR 9708470 A	13-04-1999
		CA 2247626 A	09-10-1997
		CN 1215341 A	28-04-1999
		EP 0947379 A	14-04-1999
		NO 964543 A	26-11-1998
WO 9605167 A	22-02-1996	DE 4428874 A	22-02-1996
		AT 179696 T	15-05-1999
		AU 695878 B	27-08-1998
		AU 3343395 A	07-03-1996
		CA 2197074 A	22-02-1996
		CZ 9700406 A	16-07-1997
		DE 5950506 D	10-06-1999
		EP 0775104 A	28-05-1997
		FI 970535 A	07-02-1997
		HU 77532 A	28-05-1998
		JP 10503777 T	07-04-1998
		NO 970602 A	10-02-1997
		PL 318503 A	23-06-1997
		SK 17397 A	05-11-1997
		US 5695737 A	09-12-1997
		ZA 9506650 A	19-03-1996

Source: PCT/US 98/24570 (Submitted: 05/09/98)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/24576

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0661279 A	05-07-1995	AU 687120 B	19-02-1998
		AU 8178054 A	06-07-1995
		CA 2128374 A	01-07-1995
		CN 1110974 A	01-11-1995
		CZ 9403322 A	12-07-1995
		FI 946157 A	01-07-1995
		JP 7224050 A	22-08-1995
		NO 945069 A	03-07-1995
		NZ 270289 A	29-05-1996
		US 5712389 A	27-01-1998
		US 5919432 A	06-07-1999
		ZA 9410382 A	29-06-1996
WO 9526966 A	02-11-1995	AU 2263195 A	16-11-1995
		AU 2263295 A	16-11-1995
		CA 2187921 A	02-11-1995
		CA 2188292 A	02-11-1995
		CN 1150391 A	21-08-1997
		CN 1148813 A	30-04-1997
		EP 0756496 A	05-02-1997
		EP 0755269 A	29-01-1997
		WO 9528967 A	02-11-1995
		JP 9512264 T	09-12-1997
		JP 9512265 T	09-12-1997
		US 5634020 A	10-11-1998
WO 9012050 A	18-10-1990	US 5364613 A	15-11-1994
		AT 139790 T	15-07-1996
		AT 150047 T	15-03-1997
		AU 556304 B	02-02-1995
		AU 5423590 A	05-11-1990
		CA 2051648 A	08-10-1990
		DE 69027603 B	01-08-1996
		DE 69027603 T	05-12-1996
		DE 69030186 D	17-04-1997
		DE 69030186 T	19-06-1997
		EP 0474642 A	18-03-1992
		EP 0481526 A	22-04-1992
		ES 2038428 T	16-08-1996
		ES 2098299 T	01-05-1997
		HK 1003577 A	30-10-1998
		HK 1003578 A	30-10-1998
		IE 74852 B	13-08-1997
		JP 4504436 T	06-03-1992
		NO 178866 B	11-03-1996
		US 5554749 A	10-09-1994
		US 5914095 A	22-06-1999
WO 9532741 A	07-12-1995	IT 1289839 B	15-04-1997
		AU 2566495 A	21-12-1995
		EP 0760683 A	12-03-1997
		JP 10501528 T	10-02-1998
		NO 964957 A	23-01-1997
WO 9721431 A	19-06-1997	US 5649537 A	22-07-1997
		AU 1333637 A	03-07-1997
		AU 767962 B	22-07-1998
		AU 4600936 A	03-07-1996

Source PCT/US98/24576 (US) (Pub. No. 98/024576)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 96/24570

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9721431 A		CA 2240183 A	19-06-1997

Form PCT/IS/96-10 (September 1996) (English)

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MC, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 スコット・フレイザー

アメリカ合衆国91011カリフォルニア州  
ラ・カナダ・ダートマス・プレイス609番

(72)発明者 ラッセル・ジェイコブズ

アメリカ合衆国91006カリフォルニア州ア  
ーケイディア、サウス・エイト・アベニュー  
2100番

(72)発明者 ウェンホン・リ

アメリカ合衆国91107カリフォルニア州パ  
サディナ、サウス・シエラ・マドレ・ブー  
ルバード・ナンバ―111、125番

Fターム(参考) 4C085 H007 J101 KAG0 KA28 KB07  
KB08 KB12 KB82 LL13